

19 JAN. 2005



REC'D 08 APR 2005

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 NOV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

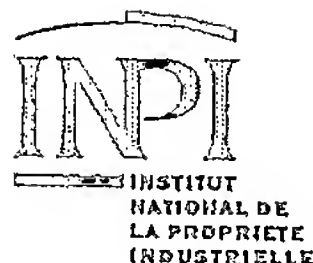


Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 e W / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 19 JAN 2004 LIEU 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT 0400433 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 19 JAN. 2004 PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS 422-5 S/002	
Vos références pour ce dossier (facultatif) B14579.3/PM BD 1524			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) DISPOSITIF DE DISPENSE DE GOUTTELETTES MICROFLUIDIQUES NOTAMMENT POUR LA CYTOMETRIE.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement Public de Caractère Scientifique, Technique et Industriel	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	31-33, rue de la Fédération	
	Code postal et ville	75 15 15 21 PARIS 15ème	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES
DATE

LIEU

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

19 JAN 2004
INPI PARIS 34 SP
0400433

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom	POULIN	
Prénom	Gérard	
Cabinet ou Société	BREVATOME	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	PG 7068	
Adresse	Rue	3, rue du Docteur Lancereaux
	Code postal et ville	75 010 18 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)	01 53 83 94 00	
N° de télécopie (facultatif)	01 45 63 83 33	
Adresse électronique (facultatif)	brevets.patents@brevallex.com	
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		I
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) G. POULIN		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE 19 JAN 2004

LIEU 75 INPI PARIS 34 SP

N° D'ENREGISTREMENT

0400433

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B14579.3/PM BD 1524	
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation	
		Date <input type="text"/>	
		N°	
		Pays ou organisation	
		Date <input type="text"/>	
		N°	
		Pays ou organisation	
		Date <input type="text"/>	
		N°	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville	11015 LAUSANNE	
	Pays	Suisse	
Nationalité		Suisse	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville	<input type="text"/>	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
II SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) G. POULIN		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

DISPOSITIF DE DISPENSE DE GOUTTELETTES MICROFLUIDIQUES
NOTAMMENT POUR LA CYTOMETRIE

DESCRIPTION

5 DOMAINE TECHNIQUE ET ART ANTÉRIEUR

L'invention concerne un procédé et un dispositif de manipulation de particules en suspension en vue d'extraire les particules d'intérêt.

10 Plus spécifiquement, l'invention se rapporte à un dispositif pour l'analyse et le tri de cellules vivantes non marquées, et la dispense sans contact, et à la demande, de gouttelettes de liquide contenant les cellules sélectionnées.

15 Ce dispositif rend possible le dépôt des cellules sur un substrat, avec en particulier une grande précision dans le positionnement des cellules. L'invention peut par exemple être utilisée pour la production de puces à cellules comprenant un ou différents types cellulaires sur un même substrat.

20 A ce titre, le dispositif selon l'invention est un instrument très flexible permettant de réaliser de manière automatisée la détection, le dénombrement, l'analyse, le tri et la dispense de particules ou de cellules.

25 La cytométrie en flux est une technique utilisée en biologie moléculaire et en biologie cellulaire, et désigne l'analyse des caractéristiques moléculaires de cellules circulant en flux continu devant un détecteur. L'analyse cytométrique permet
30 l'identification, le dénombrement et la caractérisation des cellules ou d'autres particules biologiques

(bactéries, parasites, spermatozoïdes, noyaux, chromosomes) en fonction de paramètres physico-chimiques prédéfinis par l'opérateur. L'intérêt de la cytométrie en flux repose sur la simplicité de manipulation des cellules : le capillaire à travers lequel passent les cellules est directement connecté au réservoir contenant la suspension cellulaire à caractériser.

De plus, puisque les cellules sont injectées une à une et de manière continue devant le détecteur, les vitesses d'identification des cellules sont souvent importantes et peuvent atteindre plus du millier de cellules par seconde pour certains instruments.

En revanche, la caractéristique moléculaire étudiée doit généralement être mise en évidence par une méthode de marquage, et ainsi ce n'est pas réellement le paramètre spécifié qui est détecté par l'appareil mais le marqueur qui lui est associé.

La technique la plus courante de marquage est un marqueur fluorescent greffé à un composant moléculaire spécifique des cellules étudiées ; le marqueur fluorescent est excité en flux par un faisceau laser et sa réponse est détectée par un appareillage optique et caractérisée par une électronique associée.

Toutefois, le marquage préalable des cellules nécessite une étape de préparation des cellules avant de pouvoir réaliser leur analyse. Le marquage en fluorescence présente un intérêt essentiellement pour des cellules aux caractéristiques très proches et dont les différences ne sont quasiment

pas décelables par une autre approche, par exemple des cellules d'un même type cellulaire dont une souche est saine et une autre est cancéreuse.

Il existe cependant un grand nombre de cas où la séparation d'une suspension cellulaire hétérogène peut être effectuée sur de simples critères de taille, de propriétés membranaires et/ou cytoplasmiques, cas pour lesquels un marquage n'est pas nécessaire.

Un tri non-destructif des cellules fait souvent suite à la caractérisation en flux des cellules sur la base de critères de positivité ou de négativité définis à l'avance par l'opérateur. L'échantillonnage réalisé permet d'extraire les particules d'intérêt de la solution et de les collecter en une ou plusieurs fractions purifiées dans des récipients spécifiques. La technique du tri des cellules est devenu un outil dans une large gamme de domaines tels que l'immunologie, l'oncologie, l'hématologie, la génétique...

Un besoin existe donc pour un système économique capable d'analyser en flux et de trier en conséquence une large gamme de particules, par exemple de cellules non marquées en provenance de solutions de viscosités et de concentrations protéiques variées.

Par ailleurs, il existe un besoin d'outils permettant la manipulation de particules ou de cellules uniques, en particulier pouvant séparer individuellement chaque cellule à partir d'une suspension cellulaire et positionner chacune des cellules d'intérêt dans un site spécifique.

Un besoin existe aussi pour un outil de dispense rapide, économique, flexible et facile à

opérer permettant le positionnement individuel de cellules vivantes dans des sites localisés sur un réseau à deux dimensions.

5 Toutes les méthodes connues de tri cellulaire collectent l'ensemble des cellules répondant aux critères spécifiés dans un récipient intermédiaire ou mettent en œuvre des étapes de concentration cellulaire par centrifugation, avant d'utiliser une autre technique de séparation pour disposer de cellules
10 individuelles.

Il existe donc un besoin pour supprimer l'étape intermédiaire de collecte de sous-populations purifiées, et pour séparer directement les cellules sur le substrat.

15 Toutefois, il n'existe pas à l'heure actuelle de système intégrant dans un même dispositif les fonctions d'analyse et de tri en flux de cellules ou de particules, et la dispense des cellules ou particules d'intérêt sur un substrat.

20 Le document EP1335198 décrit un dispositif comportant un canal pour l'alimentation en flux, une zone de mesure par impédancemétrie au moyen d'une série d'électrodes, une zone de tri des particules, des bandes conductrices pour transporter des signaux de et
25 vers les électrodes. Le moyen utilisé pour trier les particules est la diélectrophorèse, à l'aide d'un système d'électrodes.

Ce dispositif connu dispose d'un canal à trois branches : une branche d'entrée du fluide, et
30 deux branches de sortie, les particules étant dirigées vers l'une ou l'autre sortie. L'orientation des

particules vers telle ou telle sortie se fait nécessairement au moyen des électrodes agissant par diélectrophorèse sur les particules en suspension.

5 Ce dispositif se borne à séparer un fluide entrant en deux fluides continus, dont l'un contient des particules triées. Il ne permet pas d'extraire des microgouttelettes d'un fluide.

10 Il se pose donc le problème de trouver un dispositif permettant une extraction ou une éjection de gouttelettes.

Un système d'éjection dirigée à partir d'un fluide porteur est proposé dans la demande de brevet WO0244319, déposée par la société Picoliter. Cependant le moyen pour diriger les cellules se base sur un
15 système d'ondes focalisées, typiquement des ondes acoustiques tel que décrit dans la demande de brevet WO02/054044 déposée par la même société. La précision envisageable à l'aide d'un dispositif de focalisation par ondes acoustiques est cependant peu fiable, du fait
20 de la difficulté de focaliser une onde ultrasonore de manière précise, fiable et reproductible.

Il se pose donc également le problème de trouver un dispositif qui mette en œuvre une autre technique d'éjection.

25 EXPOSÉ DE L'INVENTION

L'invention vise à résoudre ces problèmes.

L'invention concerne d'abord un dispositif de dispense de gouttelettes comprenant :

30 - un premier canal, dit canal principal, pour une circulation d'un premier flux de fluide,

- un deuxième canal de circulation de fluide, qui forme avec le premier canal une zone d'intersection et qui se termine par un orifice d'éjection,

5 - des moyens de mesure d'une propriété physique de particules ou de cellules dans le premier canal et,

- des moyens pour engendrer une onde de pression dans le deuxième canal.

10 L'invention concerne donc un dispositif de dispense sans contact de particules ou de cellules, par exemple sur un substrat, les particules étant sélectionnées au moyen du déclenchement d'un moyen pour engendrer une onde de pression.

15 L'invention permet donc la sélection de particules ou de cellules non marquées en suspension, puis la dispense sans contact et à la demande des particules ou des cellules, par exemple sur un substrat.

20 L'invention diffère des composants selon l'art antérieur, notamment par les moyens pour engendrer une onde de pression dans un canal supplémentaire, l'orientation et l'éjection des particules se faisant sous l'impulsion de cette onde de pression.

25 En outre le dispositif selon l'invention comporte au moins deux branches de canal d'entrées : une entrée du canal principal, pour un premier fluide, et une branche d'entrée du deuxième canal.

30 Le dispositif selon l'invention inclut, dans un espace réduit, un système de détection et d'analyse des particules, par exemple par

impédancemétrie, et un microdispenseur pour l'éjection à la demande de gouttelettes contenant les microparticules d'intérêt.

5 Le dispositif peut notamment avoir des applications à de la dilution, ou au mélange, ou à la concentration, ou à d'autres applications au tri des particules.

10 Selon l'invention, l'éjection des particules n'est pas liée à un phénomène électrique appliqué directement aux particules, mais s'effectue par éjection d'une micro-gouttelette sous l'effet d'une onde de pression (peu importe la charge des particules), avec éventuellement adjonction d'un second fluide.

15 Le dispositif peut en outre comporter des moyens d'analyse des signaux électriques et de déclenchement de l'ouverture des moyens pour engendrer une onde de pression.

20 Au cas où une particule ou une cellule vérifie des critères spécifiés, le déclenchement des moyens pour engendrer une onde de pression peut être piloté par un signal ou des signaux provenant de ces moyens d'analyse ou de commande recevant des signaux des moyens de détection ou de mesure.

25 Un dispositif microfluidique selon l'invention permet l'analyse et la sélection de particules en suspension dans un fluide en flux.

L'invention permet notamment d'extraire d'un fluide des micro-gouttelettes.

30 L'invention concerne donc également un dispositif permettant la détection, et/ou le

dénombrement et/ou la caractérisation en flux de particules ou de cellules, par exemple des cellules vivantes non-marquées, suivis du tri et de la dispense des particules ou cellules d'intérêt sur un substrat.

5 Un mélange et une dispense de réactifs peuvent être obtenus dans des sites d'un substrat avant, pendant ou après la dispense d'une ou de plusieurs cellules sur ce même site.

10 Ce mode d'éjection permet le mélange de deux liquides (avec ou sans cellule présente) dans des proportions bien contrôlées, sous la forme de gouttelettes éjectées vers une surface.

15 Dans le cas d'une dispense de cellules sur une surface, un des deux liquides peut par exemple contenir des réactifs qui agiront sur la cellule après son dépôt sur un site du substrat.

20 Des cellules individuelles d'un seul ou de plusieurs types cellulaires peuvent être mises en matrice sur un substrat, pour réaliser des puces à cellules par exemple.

25 Des puces à cellules, c'est-à-dire des réseaux à deux dimensions de cellules vivantes, peuvent être produites à l'aide d'un dispositif ou d'un procédé selon l'invention en déposant des cellules individuelles dans des puits ou des trous dans un substrat non-planaire ou dans des « puits virtuels » sur un substrat planaire. Sur une puce à cellules, le criblage des cellules est mis en oeuvre sur un nombre relativement bien connu de cellules sur chaque site et
30 concerne la détection et la quantification d'une fonction ou d'une caractéristique particulière d'une

cellule parmi une population de cellules de différents types cellulaires et/ou à différentes étapes du cycle de division cellulaire. La fonction ou caractéristique cellulaire étudiée est mise en évidence sous l'effet d'un stimulus chimique, optique, électrique,... présent dans le site ou généré à l'extérieur vers la puce. Sur un substrat non-planaire, la densité de sites sur la puce dépend de spécifications physiques telles que l'épaisseur des murs entre deux puits ou deux trous, et/ou l'espace laissé entre deux sites pour des éventuelles connexions microfluidiques.

Une densité de sites très supérieure peut être atteinte en introduisant les cellules dans des puits virtuels réalisés sous forme de gouttes déposées sur un substrat planaire.

Dans le cas où les sites de dispense correspondent à des puits, par exemple des puits virtuels sur un substrat, l'invention est capable de fournir des puces à cellules de très grande densité, c'est-à-dire à des densités très supérieures à celles accessibles à partir du positionnement de cellules dans des plaques à puits ou dans des trous dans le substrat.

Un système selon l'invention peut en outre prévoir un dispositif tel que ci-dessus et un plateau porte-substrat permettant de déplacer un substrat en X, en Y et en Z avec une grande précision.

Ainsi on peut disposer les particules éjectées sur le substrat.

Eventuellement, une enceinte de contrôle de l'atmosphère enferme l'ensemble du dispositif ou du système.

Le dispositif selon l'invention peut aussi être utilisé comme un instrument pour la production de puces et pour toute autre application nécessitant un arrangement spatial particulier d'un nombre contrôlé de
5 cellules sur un substrat.

Par exemple, la faculté de déposer avec précision un nombre varié de produits et d'objets tels que des biopolymères, des cellules de différents types et des facteurs de croissance (stimulants et
10 inhibiteurs) peut s'avérer avantageuse dans le cadre de la régénération de tissus endommagés et la réalisation de tissus artificiels.

Le dispositif selon l'invention permet aussi de détecter et analyser en flux des cellules non-
15 marquées, et intègre la fonction supplémentaire de dispense d'un nombre contrôlé et reproductible de cellules sur des sites.

La sédimentation des cellules dans le dispositif est évitée grâce à une circulation continue
20 des cellules dans le dispositif selon l'invention, tandis que l'entrée d'agrégats cellulaires dans le dispositif selon l'invention peut être empêchée par les petites dimensions du dispositif.

Les volumes dispensés peuvent être réduits
25 au volume minimal nécessaire pour contenir une microparticule, ce qui permet de localiser avec précision le dépôt de chaque cellule ou particule et de réaliser des puces à cellules possédant une densité très élevée de sites.

30 Par exemple, on peut générer des gouttelettes de volume compris entre environ

1 femtolitre et 10 μ l, ou de diamètre d'environ 0,1 μ m à 2 mm ou 5 mm.

L'évaporation du milieu contenant les cellules peut être limitée par la mise en œuvre d'un
5 contrôle de l'atmosphère, en particulier d'un contrôle du degré d'hygrométrie.

Selon un mode de réalisation particulier, un dispositif selon l'invention comporte deux branches de canal principal, et au moins une branche de canal
10 secondaire, qui se rejoignent dans la zone d'intersection.

Par ailleurs, une ouverture d'entrée du premier flux de fluide peut être reliée à une première
branche du premier canal, et une ouverture d'injection
15 d'un autre flux de fluide au deuxième canal.

Le dispositif selon l'invention peut comporter au moins une couche déposée à la surface d'un premier et/ou d'un deuxième substrats ou au moins un film intercalaire inséré à l'interface d'une plaque et
20 d'une plateforme, des branches de canal étant creusées ou percées dans la ou lesdites couches ou dans le ou lesdits films intercalaires.

Au moins une ouverture et/ou un orifice peut être percé à travers l'épaisseur du substrat de la
25 plateforme et/ou de la plaque.

Chaque couche déposée à la surface de substrat ou chaque film intercalaire inséré à l'interface de la plateforme et de la plaque peut être composée d'un ou de plusieurs matériaux choisis parmi le
30 groupe de matériaux comportant les matériaux de gravure du domaine électronique, les résines, les polymères,

les matériaux diélectriques, les composés isolants d'éléments semiconducteurs, notamment les résines photosensibles ou électrosensibles, les polyimide, polystyrène, polyéthylène, polyuréthane, polyvinyl, le
5 poly-diméthylsiloxane, les nitrures, les oxydes et les composés de silicium, ainsi que le verre.

Des branches de canal peuvent former des capillaires de dimensions transversales de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres (par exemple 20 nm) à
10 quelques millimètres (par exemple 2 mm ou 5 mm).

Les moyens de mesure peuvent être de type optique et/ou électrique, par exemple des moyens de mesure d'impédance du milieu fluide. Ceci peut être réalisé avec une série d'électrodes, par exemple
15 disposées le long d'au moins une branche de canal.

Par exemple, au moins trois microélectrodes sont disposées dans une branche de canal pour mesurer une variation différentielle d'impédance.

Les moyens pour engendrer une onde de
20 pression peuvent comporter une électrovanne et/ou un actionneur physico-mécanique apte à générer une onde de pression.

Un dispositif selon l'invention peut être réalisé par assemblage d'une puce microfabriquée
25 comportant des microcanaux et une série de microélectrodes, et d'une électrovanne qui génère une onde de pression à l'origine de l'éjection des particules à l'extérieur de la puce.

Le volume d'éjection en sortie d'une
30 électrovanne peut être très précis et reproductible.

L'invention concerne également des applications liées à la production de micro-gouttelettes, dont la composition en particules a pu être ajustée ; cette technique permet une dispense sans
5 contact avec un contrôle unitaire de chaque particule, et avec des volumes de micro-gouttelettes d'un à plusieurs ordres de grandeur plus faibles que ceux de l'art antérieur.

Selon un exemple d'application un premier
10 fluide circulant dans le dispositif comporte par exemple un liquide, ou une solution, ou une suspension ou un milieu contenant des particules ou des cellules biologiques, ou des composants ou des produits cellulaires, notamment des bactéries, ou des lignées
15 cellulaires, ou des globules, ou des noyaux cellulaires, ou des chromosomes, ou des brins d'ADN ou d'ARN, ou des nucléotides, ou des ribosomes, ou des enzymes, ou des protides, ou des protéines, ou des parasites, ou des virus, ou des polymères, ou des
20 facteurs biologiques, ou des stimulants, et/ou des inhibiteurs de croissance.

Parmi les particules, sont notamment concernés des particules solides insolubles dans le liquide, telles que des particules diélectriques
25 (microbilles de latex par exemple), ou des particules magnétiques, ou des pigments (pigments d'encre par exemple), ou des colorants, ou des cristaux de protéines, ou des poudres, ou des petites structures de polymères, ou des substances pharmaceutiques
30 insolubles, ou des agrégats (ou « clusters ») de petite taille formés par agglomération de colloïdes.

Le second flux comporte par exemple des moyens de réaction ou d'interaction avec le premier fluide, notamment au moins un réactif, ou un principe actif, ou un marqueur, ou un milieu nourricier, ou un produit chimique, un anticorps, une séquence ADN, ou une enzyme, ou un protide, ou une protéine, ou un facteur biologique, ou un stimulant ou un inhibiteur de croissance.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

10 D'autres objectifs, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description ci-après de modes de réalisation, donnés à titre d'exemples non-limitatifs, en relation avec les dessins annexés, sur lesquels :

15 - les figures 1A et 1B représentent des vues ouvertes, lorsque les plaquettes sont démontées, d'un dispositif de dispense de gouttelettes selon l'invention ;

20 - la figure 2 représente une vue de dessus, après assemblage des plaquettes, d'un dispositif, selon l'invention ;

- la figure 3 représente une vue de face de l'ensemble du dispositif monté avec une électrovanne et un contrepoids, selon l'invention ;

25 - la figure 4 représente une vue de dessous du dispositif selon l'invention ;

- la figure 5 représente une vue d'ensemble d'un système associant un dispositif et une table traçante dans une enceinte, selon l'invention ;

- les figures 6A à 6D représentent des variantes de réalisation de dispositif selon l'invention.

5 DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE MODES DE RÉALISATION DE L'INVENTION

Un premier exemple d'un dispositif selon l'invention va être décrit en liaison avec la figure 1.

10 Sur cette figure, le dispositif comporte un substrat 2, par exemple en verre, sur lequel une série d'électrodes 4 est formée.

15 Une couche 6 recouvre au moins partiellement les électrodes. Cette couche est par exemple en polyimide ou en tout autre matériau pouvant être déposé sous forme de couche mince, en particulier toute résine photosensible ou électrosensible telle que, par exemple, les résines S1818 ou S1813 de la société Shipley ou des résines électrosensibles de polyméthylméthacrylate. Dans cette couche, sont formées une première et une deuxième parties 8, 10 d'un premier micro canal et une première et une deuxième parties 12, 13 d'un deuxième micro-canal, de même qu'une ouverture 20, ou orifice d'éjection.

20 Une portion 14 des micro-électrodes est en contact avec le canal 8,10.

25 A chaque extrémité des canaux 8, 10 sont définies des zones, 22,24, plus larges, qui serviront de points d'entrée et de sortie d'un fluide circulant dans le canal 8,10.

De même, une ouverture 26, servira de point d'entrée à un second fluide, destiné à circuler dans le canal 12, 13, en direction de l'orifice d'éjection 20.

Une zone d'intersection 27 se situe entre
5 le canal 12 et cet orifice d'éjection.

Sur la figure 1A, les parties 12, 13 du deuxième microcanal sont de dimension ou de section comparable au microcanal principal 8, 10, et croisent celui-ci sensiblement à angle droit. Mais un croisement
10 à angle oblique peut aussi être réalisé. Le deuxième microcanal 12,13 relie le dispositif d'actionnement de l'éjection jusqu'à l'orifice d'éjection des gouttelettes.

L'expression « canal de propulsion »
15 désigne par la suite la partie 12 du deuxième canal qui va de la zone 26 d'introduction jusqu'au canal principal, et l'expression « canal d'éjection » la partie 13 de canal qui va du canal principal 8, 10 vers l'orifice d'éjection 20.

20 La couche 6 est destinée à être recouverte par un deuxième substrat 28, par exemple lui aussi en verre, comme illustré sur la figure 2.

La figure 1B représente ce deuxième substrat 28. De préférence, ce deuxième substrat 28 est
25 muni d'une couche 6' similaire à la couche 6, munie de motifs 8', 10', 12', 13', 20' reproduisant les canaux 8, 10, 12, 13, 20' et les zones 22', 24', 26' reproduisant les zones 22, 24, 26, d'entrée et de sortie des fluides.

30 Le dispositif est assemblé en retournant la plaquette de la figure 1B sur celle de la figure 1A.

La deuxième couche 6' permet, en combinaison avec la première couche 6, un assemblage efficace des substrats.

Le deuxième substrat 28 est muni (figure 2) de trois orifices 32,34,36, qui communiquent avec les ouvertures 22,24,26 définies dans les couches 6 et 6'.

La figure 3 représente une vue en perspective du dispositif, des flèches 42,44 symbolisant l'entrée et la sortie d'un premier fluide, par exemple un milieu cellulaire. Sur cette figure, sont également représentés des moyens 40, 41 (ici : une électrovanne) pour appliquer une onde de pression dans le canal 12. Ces moyens sont représentés ici positionnés contre le substrat 28. La flèche 46 symbolise l'introduction d'un deuxième fluide à travers ces moyens 40, 41 vers le canal 12. Un contrepooids 48 peut éventuellement être fixé contre le substrat 2 opposé.

Les électrodes 4 peuvent être reliées, par des connexions électriques 5 à des moyens 50 d'analyse (figure 5), par exemple un circuit électronique. Ces moyens sont configurés ou programmés pour détecter le passage de certaines particules ou cellules au niveau des électrodes 4, dans la portion 14 de celles-ci qui traverse les canaux 8,10 (voir figure 1).

Avantageusement, les électrodes 4 et les moyens électroniques 50 constituent un dispositif d'analyse par impédancemétrie.

Si, en outre, les substrats 2, 28 sont transparents, des moyens de détection optique peuvent être mis en œuvre, dirigés vers la puce. Un signal

produit par ces moyens optiques peut être envoyé vers les moyens de contrôle 50 et utilisé, par exemple seuls ou en combinaison avec les signaux provenant des électrodes 4, pour déclencher les moyens 40 d'éjection.

5 Ainsi, on peut mettre en œuvre des techniques de détection optique à l'aide de moyens optiques dirigés entre les électrodes 14 du dispositif. Ces moyens optiques fonctionnent par exemple sur le principe de la diffusion optique au passage des cellules ou des

10 particules.

Il est également possible de faire une analyse optique seule sans recourir aux électrodes. Dans ce cas, un dispositif selon l'invention ne comporte pas nécessairement d'électrodes.

15 La figure 4 représente une vue du dispositif dans un boîtier ou moule 49, par exemple en plastique. Les références 72, 74, 76 désignent des connexions fluidiques, et les références 51, 53 des connexions électriques.

20 Le système peut être alimenté de manière continue en fluide à partir d'un réservoir 52 (figure 5) contenant, par exemple, une suspension cellulaire homogène ou hétérogène. Le fluide ou le liquide traverse le dispositif par les canaux 8,10, en ressort

25 par la deuxième ouverture 24 et est collecté dans un deuxième réservoir 54. un réservoir 56 contient le fluide qui circule dans les moyens 40, 41 et vers le canal 12.

Le microcanal principal 8,10 a de

30 préférence une section adaptée au type de particules qui doit être éjecté, par exemple entre un micromètre

et trois cents micromètres pour des cellules, et forme en quelque sorte un capillaire. Ainsi, les cellules, circulant dans le microcanal principal 8, passent devant les électrodes 14 et sont analysées une à une, par exemple par impédancemétrie, leurs propriétés électriques étant mesurées en flux à l'aide des électrodes 14. Une série de trois microélectrodes très rapprochées permet de mesurer une variation différentielle d'impédance lors du passage d'une particule et ainsi d'identifier la particule en comparant la mesure au profil d'impédance attendu, comme décrit dans la demande de brevet EP 1335198 et dans S. Gawad, L. Schild et Ph. Renaud, Lab on a chip, 2001, 1, 76-82.

Il est donc possible de réaliser l'identification de cellules ou de particules selon des caractéristiques pertinentes, détectées de manière électrique et/ou optique, en particulier sur des critères de taille, de conductivité cytoplasmique et/ou de capacitance membranaire.

Cette technique est très sensible et perçoit, par exemple, l'influence du cytoplasme ou des différences significatives pour des microbilles dont le diamètre diffère de seulement quelques microns. Des opérations de traitement des signaux électriques enregistrés peuvent être réalisées simultanément par le circuit électronique 50 afin de pouvoir détecter et caractériser les particules en temps réel, ainsi que de dénombrer chaque catégorie identifiée de particules.

Cette méthode permet en outre de mesurer la vitesse des particules lors de leur passage devant les

électrodes 14. En fonction des résultats de mesure, le dispositif peut être programmé pour paramétrer au cas par cas une décision d'éjection, comme expliqué ci-dessous.

5 En effet, les moyens 50 peuvent être configurés ou programmés pour envoyer, en fonction des mesures effectuées, une commande ou un signal vers les moyens 40. Ceux-ci vont alors générer une onde de pression qui, transmise au fluide contenu dans le canal
10 12, va pousser le fluide provenant du canal 8 et alors situé dans la zone d'intersection 27, vers l'orifice d'éjection 20. Le canal 12, 13 permet de relier le dispositif 40 d'actionnement de l'éjection jusqu'à l'orifice d'éjection 20 des gouttelettes.

15 Afin que les moyens 40 ne risquent pas d'être bouchés ou endommagés par le premier fluide circulant dans le canal principal 8, 10, ou par l'accumulation de cellules et de protéines d'un milieu cellulaire contenu dans le premier fluide, ils sont
20 situés en retrait par rapport au canal principal 8, 10. En effet, le deuxième fluide, dans le canal 12 de propulsion, agit alors comme une interface avec le fluide ou le milieu cellulaire circulant dans le canal principal 8,10.

25 Le fait que les moyens 40 soient en retrait vis-à-vis du canal principal 8, 10 permet en outre de réduire les contraintes de cisaillement sur les cellules lors de l'éjection et de centrer la majeure partie de l'onde produite vers le canal d'éjection 13.

30 D'autre part, si les dimensions du microcanal principal sont réduites, des agrégats de

cellules, qui pourraient boucher le microdispenseur, ne peuvent accéder aux moyens 40.

Une grande précision dans la décision d'éjection peut être atteinte grâce à la faible distance d (figure 1), comprise par exemple entre 5 μm et 15 μm , par exemple égale à environ 10 μm , entre la série d'électrodes 14 et la zone de croisement 27. La série d'électrodes est donc placée le plus proche possible de la zone de croisement 27.

Comme illustré sur la figure 3, la dispense des particules est donc accomplie par l'éjection, hors du dispositif, d'une gouttelette 60, contenant la particule d'intérêt, par exemple vers un site d'un substrat. La position relative d'un dispositif selon l'invention et d'un tel substrat 71 est en fait illustrée sur la figure 5. L'éjection des particules d'intérêt permet un tri des particules en fonction de critères préétablis par l'opérateur.

La détection et l'éjection des particules d'intérêt peuvent être coordonnées grâce aux moyens 50 qui peuvent analyser, en temps réel, les signaux électriques mesurés entre les électrodes 4. En particulier, la largeur et/ou l'instant de déclenchement et/ou la forme et/ou l'intensité d'un signal de commande peuvent être adaptés par les moyens 50. En conséquence, chaque gouttelette 60 produite contient une microparticule d'intérêt, et peut être éjectée vers un récipient particulier ou vers un site particulier sur un substrat.

Un procédé de dispense à la demande selon l'invention met donc en œuvre une onde de pression

exercée, dans l'exemple donné, par une vanne miniature 40 (figure 3) commandée électriquement par un microsolénoïde, le tout étant piloté par les moyens 50.

Selon un mode particulier de réalisation
5 une électrovanne peut être intégrée directement sur la puce par des techniques de microfabrication. D'autres moyens peuvent aussi être utilisés pour générer l'onde de pression à la place de l'électrovanne. Par exemple, des dispenseurs à la demande de type piézoélectrique,
10 ou acoustique, ou électromécanique, ou pneumatique ou actionné par une bulle d'air ou de solvant peuvent être utilisés, en remplaçant la vanne miniature à l'extrémité du canal 12 de propulsion par un matériau piézoélectrique, ou un transducteur électroacoustique,
15 ou un actionneur mécanique, ou un piston, ou une résistance chauffante.

Dans le cas d'une dispense à la demande de type thermique, l'éloignement relatif de la résistance chauffante (du fait de la portion de canal 12 qui
20 sépare les moyens 40 du canal principal 8, 10) évite d'endommager les cellules et favorise ainsi leur taux de survie.

Lorsqu'une particule est détectée par les moyens 50 comme vérifiant des critères spécifiés, une
25 impulsion de pression est appliquée par les moyens 40 et une gouttelette 60 est éjectée à travers l'orifice d'éjection. L'onde de pression à la base de l'éjection est générée par un second fluide ou liquide 46 propulsé par les moyens 40 (figure 3). Ce fluide ou ce liquide
30 est conduit à travers le canal de propulsion 12 en vis-à-vis du canal d'éjection 13, traverse le canal

principal 8, 10 et est expulsé à travers l'orifice d'éjection 20. Par ce mouvement, une portion de liquide est extraite du canal principal et poussée vers l'orifice d'éjection 20 selon une direction sensiblement perpendiculaire à son déplacement initial, ou selon une autre direction si le canal d'éjection et le canal principal ne se croisent pas à angle droit. L'élément de volume éjecté du canal principal contient la fraction d'intérêt uniquement, en particulier l'élément de volume qui renferme la cellule ou particule d'intérêt.

En dehors de toute éjection, le canal d'éjection 13 est rempli par action capillaire. Le liquide est retenu par sa tension de surface au niveau de l'orifice d'éjection 20. Ce second liquide, propulsé par les moyens 40, est initialement au repos dans le canal de propulsion.

L'application d'une impulsion de pression produit l'éjection d'une gouttelette dont le volume est fixé par la forme et la durée de l'impulsion.

Pour une impulsion identique, le même volume est dispensé quelles que soient la densité, la viscosité et la tension de surface du liquide et les variations éventuelles des conditions atmosphériques.

Le volume dispensé peut être contrôlé précisément en ajustant, à l'aide des moyens 50, par exemple programmés à cet effet, l'instant de déclenchement et/ou la durée d'ouverture et/ou la forme et/ou l'intensité de l'impulsion électrique pilotant les moyens 40. Le volume éjecté est par exemple compris

entre 0,1 pL et 10 μ L, en fonction des dimensions des canaux et des paramètres d'impulsion de l'électrovanne.

Un mode d'utilisation du microdispenseur selon l'invention est donc la production de
5 gouttelettes dont chacune contient une microparticule d'intérêt.

Le microdispenseur selon l'invention intègre donc les fonctions de chargement du liquide, d'analyse des microparticules ou des cellules vivantes
10 non-marquées, de séparation et d'éjection des cellules ou particules d'intérêt, et de sortie du liquide avec les cellules ou particules refusées.

Les microparticules d'intérêt peuvent être détectées et analysées en flux par impédancemétrie
15 (détection électrique) et/ou par détection optique en amont de la zone d'éjection. Le mode d'éjection des gouttelettes peut être du type à la demande (DOD, Drop On Demand) et sans contact, produisant une dispense à
partir d'un flux, de l'élément de volume d'intérêt,
20 c'est-à-dire contenant une microparticule sélectionnée.

La figure 5 représente un système 70 porte-substrat, de type table traçante qui régit les déplacements d'un substrat 71 en X, en Y et en Z, avec une certaine précision (de préférence micrométrique),
25 dans l'objectif de réceptionner les gouttelettes 60 contenant chacune une cellule sur des sites adéquats d'un substrat. Les déplacements de la table traçante peuvent être coordonnés avec les éjections de gouttelettes, à l'aide des moyens 50. En particulier
30 les positions du plateau porte-substrat sous la buse d'éjection peuvent être pilotées en fonction du type de

cellule ou de particule détectée. L'identification de la microparticule, à l'aide des moyens 50, permet donc à la fois l'opération de dispense ou d'éjection et le positionnement du site sur le substrat.

5 Un autre mode d'utilisation d'un dispositif selon l'invention est l'éjection d'une série de gouttelettes dont l'une contient la microparticule. L'alignement de la tête de dispense et du substrat 71 permet de contrôler le nombre de gouttelettes déposées
10 dans chaque site et, si nécessaire, d'ajouter ultérieurement de nouvelles gouttelettes sur les sites dispensés.

La concentration de particules sur un site du substrat dépend du nombre de gouttelettes
15 dispensées, en particulier la concentration de particules peut être inférieure ou supérieure à la concentration initiale dans le réservoir.

En outre, le dispositif permet d'ajouter, de façon ponctuelle ou régulière, du solvant et/ou des
20 réactifs avec une très grande précision, par exemple dans le cadre d'expériences dépendant du temps.

Le liquide 46 propulsé par les moyens 40 peut être le même ou non que le liquide dans le canal principal 8, 10 qui contient les particules. Une
25 possibilité de mélange de deux liquides au moment de l'éjection est incluse lorsque les deux liquides sont différents ou si le liquide propulsé par l'électrovanne contient un produit particulier.

Cette fonction de mélange permet par
30 exemple d'introduire des réactifs dans la gouttelette contenant une cellule, qui agiront sur la cellule après

le dépôt sur le site. Un mélange ultérieur est également possible avec le même dispositif, en déposant de nouvelles gouttelettes sur des sites déjà existants sur un substrat 71.

5 A titre d'exemple, les réactifs peuvent être des principes actifs, des marqueurs immunofluorescents ciblant des antigènes spécifiques, des marqueurs de métabolisme ou de viabilité tels que le bleu trypan, ou des produits toxiques, ou des
10 séquences ADN pour une transfection des cellules.

Les réactifs peuvent également être des protéines, par exemple des enzymes telles que la trypsine. Le dépôt de deux types cellulaires sur le même site permet de réaliser l'étude d'interactions
15 cellule-cellule. Le dispensateur peut également être connecté en amont ou en aval avec d'autres dispositifs d'analyse en flux tels que par exemple l'électrophorèse capillaire, et/ou la spectroscopie de masse.

Le microdispenseur selon l'invention peut
20 être réalisé à l'aide des techniques conventionnelles de microfabrication en salle blanche. Un exemple de procédé de réalisation va être décrit.

Un premier masque optique est employé pour produire les motifs des microélectrodes dans une
25 photorésine (par exemple disponible sous la référence commerciale « AZ5214 ») sur une plaquette en verre, par exemple de quatre pouces (soit 10 cm environ), et déposer une bicouche métallique de 50 nm de titane et de 150 nm de platine par pulvérisation cathodique.

30 Les microélectrodes 14 ont une largeur de 20 μm , une distance inter-électrode comprise entre

20 μm et 50 μm , et s'étendent jusqu'à des plots 5 de contact électrique situés sur le côté opposé de la puce (figure 1).

5 Le microdispenseur peut être fabriqué en assemblant deux puces identiques l'une sur l'autre, à la différence que des microélectrodes 14 peuvent n'être réalisées que sur l'une d'entre elles. Les microélectrodes peuvent donc être produites sur un côté seulement de la plaquette de verre, par exemple le côté
10 gauche tandis qu'aucune électrode n'est fabriquée sur le côté droit.

Les microcanaux sont définis dans une photorésine de polyimide (PI-2732, Dupont) grâce à un second masque optique. Les dimensions du microcanal
15 principal 8,10, du canal 12 de propulsion et du canal 13 d'éjection sont de préférence semblables dans la zone de croisement 27, avec une section adaptée au type de particules qui doit être éjecté. La largeur des microcanaux est typiquement comprise entre 1 μm et
20 300 μm . La hauteur des canaux, déterminée par l'épaisseur des couches 6,6' de polyimide, peut être comprise entre 100 nm et 75 μm ; puisque le microdispenseur peut être obtenu par assemblage de deux puces d'épaisseur identique, il suffit de déposer une
25 épaisseur de polyimide égale à la moitié de celle recherchée (entre 50 nm et 38 μm).

Les épaisseurs de polyimide 6,6' peuvent être comprises entre 15 μm et 25 μm , et les épaisseurs des canaux obtenus dans cette couche 6,6' entre 30 μm
30 et 50 μm , tandis que les largeurs des canaux sont comprises entre 50 μm et 100 μm dans la zone 27 de

croisement des microcanaux. La plaquette de verre est découpée en deux morceaux, l'un portant les microélectrodes, l'autre n'en portant aucune. Les deux morceaux sont alignés l'un sur l'autre pour former les
5 microcanaux et assemblés par un recuit thermique à 300°C sous atmosphère d'azote.

Les puces sont découpées pour séparer les microdispenseurs et dégager les plots 5 des microélectrodes. Trois ouvertures sont produites dans
10 chaque dispositif par électroérosion avec une pointe en tungstène : deux ouvertures à chaque extrémité du microcanal principal constituent l'entrée et la sortie du solvant contenant les microparticules, la troisième ouverture près du centre du microdispenseur est dédiée
15 au positionnement de l'électrovanne. Dans une configuration, l'ouverture 36 pour l'électrovanne est réalisée sur la plaquette de verre 2 qui porte les électrodes 14,4,5. Dans une autre configuration illustrée figure 2, l'ouverture 36 pour l'électrovanne
20 40 est réalisée sur la plaquette de verre 28 opposée à la plaquette 2 qui porte les électrodes 14,4,5 et qui forme la plateforme. Chacune des ouvertures 32,34,36 peut être réalisée d'un côté quelconque du microdispenseur, en particulier les ouvertures 32,34
25 pour l'entrée et la sortie du solvant et l'ouverture 36 de l'électrovanne peuvent être situées du même côté ou placées en opposition.

L'électrovanne employée est par exemple une vanne de microdispense VHS Small Port INKA 4026212H
30 (The Lee Company, Westbrook, USA), avec un orifice de sortie de 100 µm de diamètre interne, maintenue contre

la puce avec un joint étanche de polydiméthylsiloxane (PDMS) ou avec un joint torique (« O-Ring » en plastique. L'assemblage électrovanne-puce est stabilisé en maintenant un contrepoids 48 sur la puce du côté opposé de l'électrovanne, ce qui permet de supporter fermement la puce dans le plan vertical et d'éjecter des gouttelettes vers le bas. L'électrovanne 40 et le contrepoids 48 sont soutenus dans la direction orthogonale au plan de la puce grâce à un moule 49 de plastique qui englobe la puce, l'électrovanne, le contrepoids et les connexions fluidiques aux réservoirs.

Le dessin du microdispenseur est de préférence symétrique par rapport à l'axe formé par les canaux de propulsion 12 et d'éjection 13 : les canaux 8,10 et les microélectrodes 14 sont reproduites à l'identique par rapport à cet axe de symétrie. Dans cette configuration, l'entrée et la sortie sont interchangeables puisqu'une détection des microparticules peut être effectuée des deux côtés du microdispenseur. En outre, la présence de microélectrodes 14 après le canal d'éjection 13 permet de suivre les déplacements des cellules ou particules qui n'ont pas été sélectionnées pour l'éjection.

Un suivi optique des déplacements des microparticules peut également être réalisé à travers les deux faces du microdispenseur, lorsque celui-ci est fabriqué à partir d'une plaquette de verre (matériau transparent). En particulier, l'observation optique des microparticules est profitable lors des premiers ajustements effectués pour coordonner la détection

électrique des cellules ou particules et le déclenchement de l'ouverture de l'électrovanne.

Dans une autre configuration illustrée par exemple sur la figure 6C, les microélectrodes 63,65
5 sont disposées des deux côtés du microdispenseur. Dans ce cas, la différence d'impédance est mesurée entre deux électrodes 63/65 en vis-à-vis, comme spécifié dans S. Gawad et al., Lab on a chip, 2001, 1, 76-82.

Dans une autre configuration,
10 l'électrovanne 40 est placée au-dessus du microcanal principal, et les canaux de propulsion 66 et d'éjection 68 consistent en des ouvertures réalisées à travers les substrats en verre 28 et 2, comme illustré sur les figures 6A à 6D. Dans ce cas, l'éjection de
15 gouttelettes 60 est produite directement dans l'axe de l'électrovanne 40.

Plusieurs types de matériaux sont possibles pour les substrats du microdispenseur et pour réaliser les microcanaux, mais les matériaux utilisés sont de
20 préférence isolants (pour ne pas perturber l'analyse électrique) et biocompatibles : résines photosensibles ou électrosensibles, polymères (polystyrène, polyéthylène, polyuréthane, poly(diméthylsiloxane) (PDMS), poly(vinyl chloride),...), couches isolantes
25 déposées par dépôt chimique en phase vapeur (Chemical Vapor Deposition, CVD) telles que des couches de Si₃N₄ ou de SiO₂,...

Une possibilité est de réaliser les microcanaux directement dans le substrat en verre par
30 gravure chimique au BHF (acide fluorhydrique tamponné) ou au HF (acide fluorhydrique) dilué et de

sceller les deux puces par collage ou par soudure directe.

L'invention décrite est très flexible et s'adapte aux spécifications recherchées par l'utilisateur. En particulier, le dispositif peut être
5 utilisé pour une partie seulement de ses fonctions.

Par exemple, une application est le simple dénombrement en flux des cellules sans éjection ultérieure. Une autre opération possible est la
10 caractérisation et le dénombrement en flux des cellules sans éjection. Le dénombrement peut être effectué à l'aide des moyens 50, qui comptabilisent les particules ou les cellules présentant des caractéristiques
données, mesurées à l'aide des moyens de mesure
15 électrique et/ou optiques tels que décrits ci-dessus.

Une application est la dilution de particules : les gouttelettes 60 sont formées par mélange du liquide circulant dans le premier canal et du liquide propulsé par le système produisant l'onde de
20 pression (par exemple, une électrovanne). Le volume des gouttelettes est proportionnel au temps d'ouverture du système produisant l'onde de pression. Une dilution peut ainsi être effectuée en augmentant le volume de la gouttelette éjectée.

25 Une autre possibilité de dilution concerne la gouttelette déposée sur le substrat, constituée de plusieurs gouttelettes plus petites éjectées par le dispensateur. Certaines des gouttelettes éjectées peuvent correspondre à des gouttelettes « vides », c'est-à-
30 dire à des gouttelettes sans cellules ou particules qui

augmentent le volume de la gouttelette sur le substrat et donc diluent les composants qui y sont contenus.

Une autre application concerne le tri et l'éjection des cellules vers un ou plusieurs récipients sans disposition particulière des cellules sur un substrat.

Plus généralement, le tri concerne la possibilité de laisser les cellules ou particules circuler vers la sortie 24 du premier canal (figure 1A) ou de les propulser à l'extérieur du dispensateur sous forme de gouttelettes. La séparation des cellules ou particules vers deux sorties est donc réalisée au niveau de l'intersection 27 des deux canaux, en fonction des signaux enregistrés par le système de détection.

Une autre forme de tri consiste à positionner un substrat 71 en fonction de la cellule contenue dans la gouttelette éjectée afin que les cellules soient collectées dans des récipients différents selon le type cellulaire. Ceci permet d'obtenir des cultures cellulaires purifiées dans des récipients particuliers.

L'invention permet de délivrer des nombres précis de cellules vers des récipients ou vers des sites déterminés sur un substrat, par exemple pour des applications de tri, et/ou de distribution, et/ou de dosage et/ou de transfert d'échantillons.

Le microdispenseur peut être employé pour extraire une ou quelques cellules du milieu avec la possibilité de contrôler précisément le volume de liquide qui les contient, et par conséquent de

concentrer les cellules sur le site ou bien de les diluer par ajout sur le site de gouttelettes supplémentaires sans cellules.

5 Le matriçage des cellules sur un substrat peut concerner une ou plusieurs cellules sur chaque site. Dans le cas de sites contenant plusieurs cellules, un seul ou plusieurs types cellulaires peuvent être déposés sur un même site.

10 Des gouttelettes sans cellules peuvent être volontairement ajoutées dans des sites du substrat, que ceux-ci contiennent des cellules ou non, par exemple pour délivrer des réactifs en quantité très précise sur le site ou pour compenser l'évaporation du liquide sur le substrat.

15 De façon avantageuse, la taille réduite du dispositif (1 cm à 3 cm de côté) permet la manipulation de volumes réduits de suspension cellulaire, par exemple pour prélever des échantillons rares ou précieux, ou pour extraire des cellules en très petite
20 quantité diluées dans un volume relativement grand de liquide. La concentration cellulaire initiale dans le réservoir peut être faible et adaptée au nombre total de cellules qui doivent être dispensées, ce qui permet de réaliser des dispenses de cellules à partir de
25 petits échantillons extraits de milieux cellulaires plus importants. Le microdispenseur permet potentiellement de dispenser toutes les cellules d'intérêt d'un milieu, si nécessaire (par exemple si le nombre de cellules est élevé et ne permet pas de
30 déclencher toutes les opérations d'éjection pendant un seul passage) en mettant en œuvre une connexion en

boucle de la sortie et de l'entrée du dispenseur afin de réaliser plusieurs passages successifs du milieu dans le dispositif.

Comme illustré sur la figure 5, l'ensemble de l'instrumentation 49,50,52,54,56 du dispositif et de la table traçante 70,71 est placé dans une enceinte 500 pour le contrôle de l'atmosphère, c'est-à-dire le contrôle de l'humidité, de la pression et de la température. Une meilleure fiabilité et une meilleure précision sont obtenues lors de la production des spots grâce à une réduction des mouvements de l'air pendant la dispense. De plus, le contrôle des conditions environnementales permet de générer un degré d'hygrométrie de l'air supérieur à 80 % et minimise ainsi l'évaporation des gouttes sur les sites du substrat. D'une manière générale, l'évaporation à l'air ambiant des gouttes de milieu cellulaire est d'environ 3 nL/min pour des volumes dispensés de l'ordre de 10 nL, et donc la mise en place d'un système d'air fortement chargé en humidité permet de conserver les gouttes produites au moins deux semaines sans grande variation de leur volume.

REVENDICATIONS

1. Dispositif de dispense de gouttelettes comprenant :

5 - un premier canal (8, 10), dit canal principal, pour une circulation d'un premier flux de fluide,

10 - un deuxième canal (12, 13) de circulation de fluide, qui forme avec le premier canal une zone d'intersection (27) et qui se termine par un orifice d'éjection (20),

 - des moyens (4, 14) de mesure d'une propriété physique de particules ou de cellules dans le premier canal et,

15 - des moyens (40) pour engendrer une onde de pression dans le deuxième canal.

2. Dispositif selon la revendication précédente, comportant deux branches (8, 10) du canal principal, et au moins une branche de canal secondaire, 20 qui se rejoignent dans la zone d'intersection (27).

3. Dispositif selon la revendication précédente, comportant une ouverture (22) d'entrée du premier flux de fluide reliée à une première branche 25 (8) du premier canal, et une ouverture (26) d'injection d'un autre flux de fluide dans le deuxième canal.

4. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le deuxième canal

comporte des branches (12,13) de part et d'autre du canal principal (8,10).

5. Dispositif selon l'une des
5 revendications 1 à 4, dans lequel, outre l'orifice d'éjection de gouttelettes (20) qui fournit une sortie d'une partie de flux, le dispositif comporte un autre orifice (24) ou ouverture de sortie d'une autre partie de flux.

10

6. Dispositif selon l'une des
revendications 1 à 5, dans lequel le composant comporte une plateforme (2) d'un premier substrat et une plaque (28) d'un deuxième substrat recouvrant la plateforme,
15 dans ou sur ou entre lesquelles, ou à l'interface desquelles sont aménagés les branches (8,10,12,13) de canal.

7. Dispositif selon la revendication 6,
20 dans lequel le composant comporte en outre au moins une couche (6,6') déposée à la surface du et/ou des substrats (2,28) ou au moins un film intercalaire inséré à l'interface de la plaque (28) et de la plateforme(2), les branches (8,10,12,13) de canal étant
25 creusées ou percées dans la ou lesdites couches ou dans le ou lesdits films intercalaires.

8. Dispositif selon la revendication 6 ou
7 dans lequel au moins une ouverture et/ou un orifice
30 (32,34,36/62,64,66,68) est percé à travers l'épaisseur

du substrat de la plateforme (2) et/ou de la plaque (28).

9. Dispositif selon l'une des
5 revendications 6 à 8, dans lequel chaque couche (6,6')
déposée à la surface de substrat (2,28) ou chaque film
intercalaire inséré à l'interface de la plateforme (2)
et de la plaque (28) est composé d'un ou de plusieurs
matériaux choisis parmi le groupe de matériaux
10 comportant les matériaux de gravure du domaine
électronique, les résines, les polymères, les matériaux
diélectriques, les composés isolants d'éléments
semiconducteurs, notamment les résines photosensibles
ou électrosensibles, les polyimide, polystyrène,
15 polyéthylène, polyuréthane, polyvinyl, le poly-
diméthylsiloxane, les nitrures, les oxydes et les
composés de silicium, ainsi que le verre.

10. Dispositif selon l'une des
20 revendications 6 à 9, dans lequel le substrat de la
plateforme et/ou de la plaque (2,28) est en verre.

11. Dispositif selon la revendication 10,
dans lequel au moins un orifice (34,64,68) et/ou une
25 ouverture (32,62,68) et/ou au moins une branche de
canal (8,10,12,13,66,68) est percée ou creusée dans le
substrat en verre.

12. Dispositif selon l'une des
30 revendications 1 à 11, dans lequel les branches de
canal (8,10,12,13) forment des capillaires de

dimensions transversales de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres à quelques millimètres.

13. Dispositif selon l'une des
5 revendications 1 à 12, comportant des moyens de mesure de propriétés optiques d'un flux de fluide.

14. Dispositif selon l'une des
revendications 1 à 13, comportant des moyens (4,5,14)
10 de mesure de paramètres électriques d'un flux de fluide.

15. Dispositif selon la revendication 14,
dans lequel une zone de mesure des paramètres
15 électriques est disposée à proximité de la zone d'intersection (27).

16. Dispositif selon l'une des
revendications 1 à 15, comportant des moyens de mesure
20 d'impédance du milieu.

17. Dispositif selon l'une des
revendications 1 à 16, les moyens de mesure comportant
une série d'électrodes (5,4,14).

25

18. Dispositif selon la revendication 17,
dans lequel des électrodes (14,63,65) sont disposées le
long d'au moins une branche de canal (8,10).

30 19. Dispositif selon la revendication 16 ou
17, dans lequel des électrodes appariées (63,65) sont

disposées de part et d'autre d'une branche de canal (8,10).

20. Dispositif selon l'une des
5 revendications 1 à 19, dans lequel au moins trois microélectrodes (14) sont disposées dans une branche de canal (8) pour mesurer une variation différentielle d'impédance.

10 21. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce qu'il comporte une électrovanne (40) et/ou un actionneur physico-mécanique apte à générer une onde de pression et/ou un flux.

15 22. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 21, comportant des moyens (50) pour recevoir, des moyens (4) de mesure de propriétés physiques, des signaux de mesure et pour envoyer un
20 signal de commande vers les moyens (40) pour engendrer une onde de pression.

23. Dispositif selon la revendication 22, dans lequel les moyens de commande (50) sont aptes à
25 contrôler l'amplitude et/ou l'instant de déclenchement, et/ou la forme, et/ou la durée du signal de commande.

24. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 23, comprenant en outre des moyens
30 (52,54) d'alimentation et/ou de circulation continue de fluide dans le canal principal.

25. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 24, comprenant en outre au moins un réservoir (52,54) relié à une branche de canal respective (8,10), destiné à contenir un liquide, notamment un liquide ou un milieu comprenant une solution ou une suspension cellulaire.

26. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 25, comprenant en outre une enceinte de confinement (500).

27. Système de dépôt d'au moins un échantillon (60) sur un substrat (71) comprenant un dispositif (50) de dispense de gouttelettes selon l'une des revendications précédentes, associé à des moyens (70) de balayage ou de déplacement relatif (70) du substrat et du dispositif de dispense permettant de déposer les gouttelettes éjectées (60) de place en place sur le substrat (71).

20

28. Procédé de dispense de gouttelettes (60), mettant en œuvre un premier canal (8,10) et un deuxième canal qui forme avec le premier canal une zone d'intersection (27) et qui se termine par un orifice d'éjection (20), le procédé comportant des étapes consistant à :

- mettre un premier fluide en circulation dans le premier canal ;
- mesurer une propriété physique ou analyser le contenu du flux du premier fluide ; et ,

30

- en fonction des résultats de l'étape précédente, engendrer une onde de pression ou injecter un second flux de fluide dans ou vers la zone d'intersection.

5

29. Procédé selon la revendication 28 , comportant des étapes consistant à :

- alimenter une ouverture d'entrée (32) d'une branche du canal (8) par un flux continu du premier fluide ;

10

- alimenter une ouverture d'injection (26,36) communiquant avec la zone d'intersection (27) par un flux du second fluide ;

15

30. Procédé selon la revendication 28 ou 29, dans lequel on recueille une dilution ou un mélange du premier fluide et du second fluide à une ouverture de sortie (34) du canal ou à l'orifice (20) d'éjection de gouttelettes.

20

31. Procédé selon l'une des revendications 28 à 30, dans lequel on recueille une concentration, une séparation, et/ou une extraction, et/ou une sélection et/ou une collection de composants du premier fluide à l'orifice d'éjection de gouttelettes ou à l'ouverture de sortie du canal.

25

32. Procédé selon l'une des revendications 28 à 31, dans lequel le second flux injecté est composé d'un autre fluide que le premier fluide.

30

33. Procédé selon l'une des revendications 28 à 31, dans lequel le second flux injecté est composé d'un fluide, ou d'un liquide, ou d'un solvant et/ou d'un milieu identique au premier fluide.

5

34. Procédé selon l'une des revendications 28 à 33, dans lequel le premier fluide comporte un liquide, ou une solution, ou une suspension ou un milieu contenant des cellules biologiques, et/ou des composants et/ou des produits cellulaires, notamment des bactéries, et/ou des lignées cellulaires, et/ou des globules, et/ou des noyaux cellulaires, et/ou des chromosomes, et/ou des brins d'ADN ou d'ARN, et/ou des nucléotides, et/ou des ribosomes, et/ou des enzymes, et/ou des protides, et/ou des protéines, et/ou des parasites, et/ou des virus, et/ou des polymères, et/ou des facteurs biologiques, et/ou des stimulants, et/ou des inhibiteurs de croissance.

20

35. Procédé selon l'une des revendications 28 à 34, dans lequel le premier fluide comporte un liquide ou une solution, ou une suspension, ou un milieu contenant des particules.

25

36. Procédé selon la revendication 35, les particules étant des particules solides insolubles dans le liquide, telles que des particules diélectriques ou des particules électriques, ou des particules magnétiques, ou des pigments, ou des colorants, ou des cristaux de protéines, ou des poudres, ou des structures de polymères, ou des substances

30

pharmaceutiques insolubles, ou des clusters ou agrégats de petite taille formés par agglomération de colloïdes.

37. Procédé selon l'une des revendications
5 28 à 36, dans lequel le second flux comporte des moyens de réaction ou d'interaction avec le premier fluide, notamment au moins un réactif et/ou un principe actif, et/ou un marqueur, et/ou un milieu nourricier, et/ou un produit chimique, et/ou un anticorps, et/ou une
10 séquence ADN, et/ou une enzyme, et/ou un protide, et/ou une protéine, et/ou un facteur biologique, et/ou un stimulant, et/ou un inhibiteur de croissance.

38. Procédé selon l'une des revendications
15 28 à 37, comportant une étape intercalaire consistant à :

- déclencher une impulsion de commande d'éjection de gouttelettes au moment du passage d'un contenu d'intérêt.

20

39. Procédé selon l'une des revendications
28 à 38, comportant une étape intercalaire consistant à :

- effectuer une analyse cytométrique du
25 flux du premier fluide pour détecter des particules ou des cellules biologiques, des composants ou des produits cellulaires contenus dans le flux ; et,

- déclencher une impulsion de commande d'éjection de gouttelettes pour isoler les particules
30 ou les cellules biologiques, les composants ou les produits cellulaires, détectés.

40. Procédé selon l'une des revendications 28 à 39, l'étape de mesure comportant au moins une mesure de paramètre électrique et/ou une mesure d'impédance ou de variation différentielle d'impédance
5 du contenu du flux du premier fluide circulant dans le canal.

41. Procédé selon l'une des revendications 28 à 40, l'étape de mesure comportant une mesure
10 optique du contenu du flux du premier fluide circulant dans le canal.

42. Procédé selon l'une des revendications 28 à 41, comportant une étape consistant à :
15 - délivrer une commande électrique calibrée pour injecter le second flux de fluide vers la zone d'intersection.

43. Procédé selon la revendication 42, dans
20 lequel la commande électrique a une amplitude et/ou un instant de déclenchement et/ou une forme et/ou une durée d'impulsion contrôlée afin d'éjecter une gouttelette de volume contrôlé ou calibré.

25 44. Procédé selon l'une des revendications 28 à 43, dans lequel on génère des gouttelettes de faible volume, notamment de l'ordre du femtoLitre au microLitre, ou de diamètre micrométrique, de l'ordre de 0,1 μm à quelques millimètres.

45. Procédé selon l'une des revendications 28 à 44, dans lequel on éjecte des gouttelettes de fluide (60) de place en place sur un substrat (71) ou un support (70).

5

46. Procédé selon l'une des revendications 28 à 45, caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre dans une atmosphère confinée (500).

10

47. Procédé selon l'une des revendications 28 à 46, appliqué à une extraction, une sélection et/ou un tri de lignées cellulaires.

15

48. Procédé selon l'une des revendications 28 à 47, appliqué à une détection, et/ou une identification, et/ou un dénombrement et/ou une caractérisation de particules ou de cellules biologiques, de composants ou de produits cellulaires.

20

49. Procédé selon l'une des revendications 28 à 48, appliqué au dépôt de particules ou de cellules biologiques, ou de composants ou de produits cellulaires, sur des sites privilégiés d'implantation et/ou de croissance et/ou de régénération et/ou de greffe, notamment des lignées cellulaires, ou des biopolymères, ou des facteurs biologiques, ou des stimulants ou des inhibiteurs de croissance.

25

50. Procédé selon l'une des revendications 28 à 49, appliqué à la dispense de microflux de réactif biologique ou chimique aux endroits correspondants où

30

sont dispensées des gouttelettes contenant des composants biologiques actifs, la dispense de réactif s'effectuant soit pendant la dispense des composants biologiques actifs soit par dispense différée d'autres gouttelettes sur des sites sur lesquels les gouttelettes de composants biologiques actifs ont été déposées auparavant ou seront déposées après.

51. Procédé de comptage de particules, mettant en œuvre un dispositif selon l'une des revendications 1 à 26, un fluide contenant des particules circulant dans le premier canal, et les particules étant comptées à l'aide des moyens de mesures (4, 14) ou de moyens optiques.

2/5

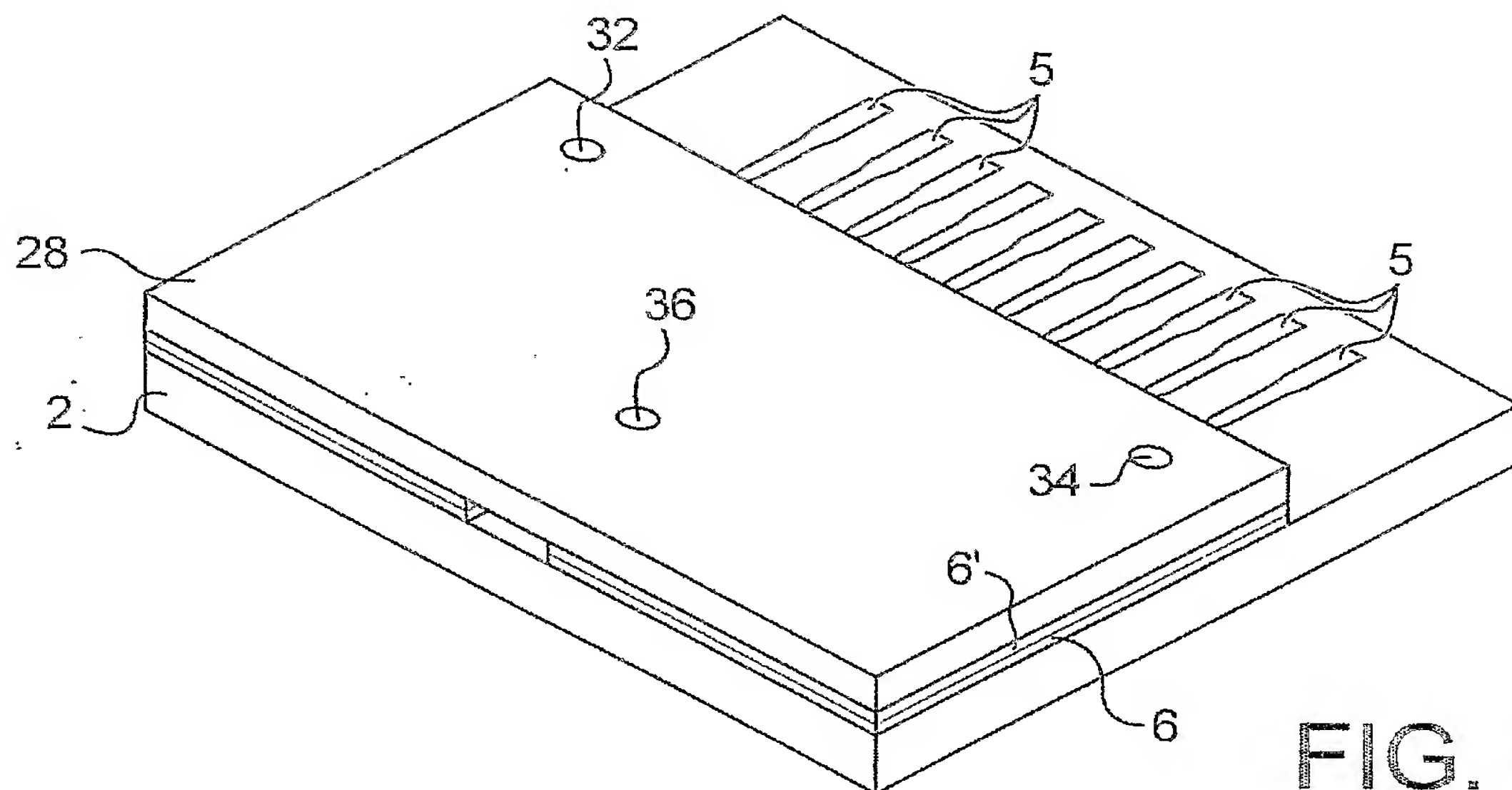


FIG. 2

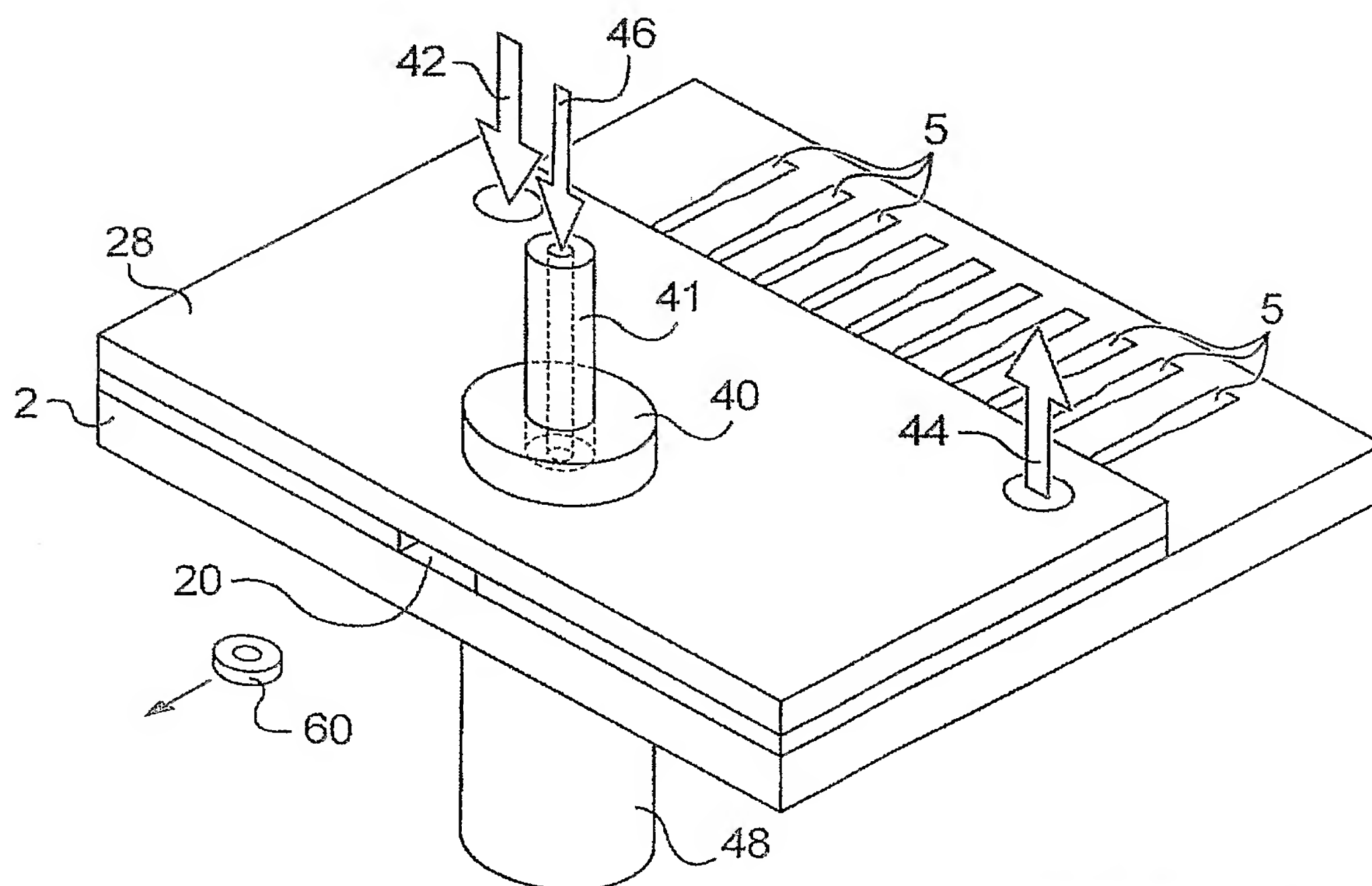


FIG. 3

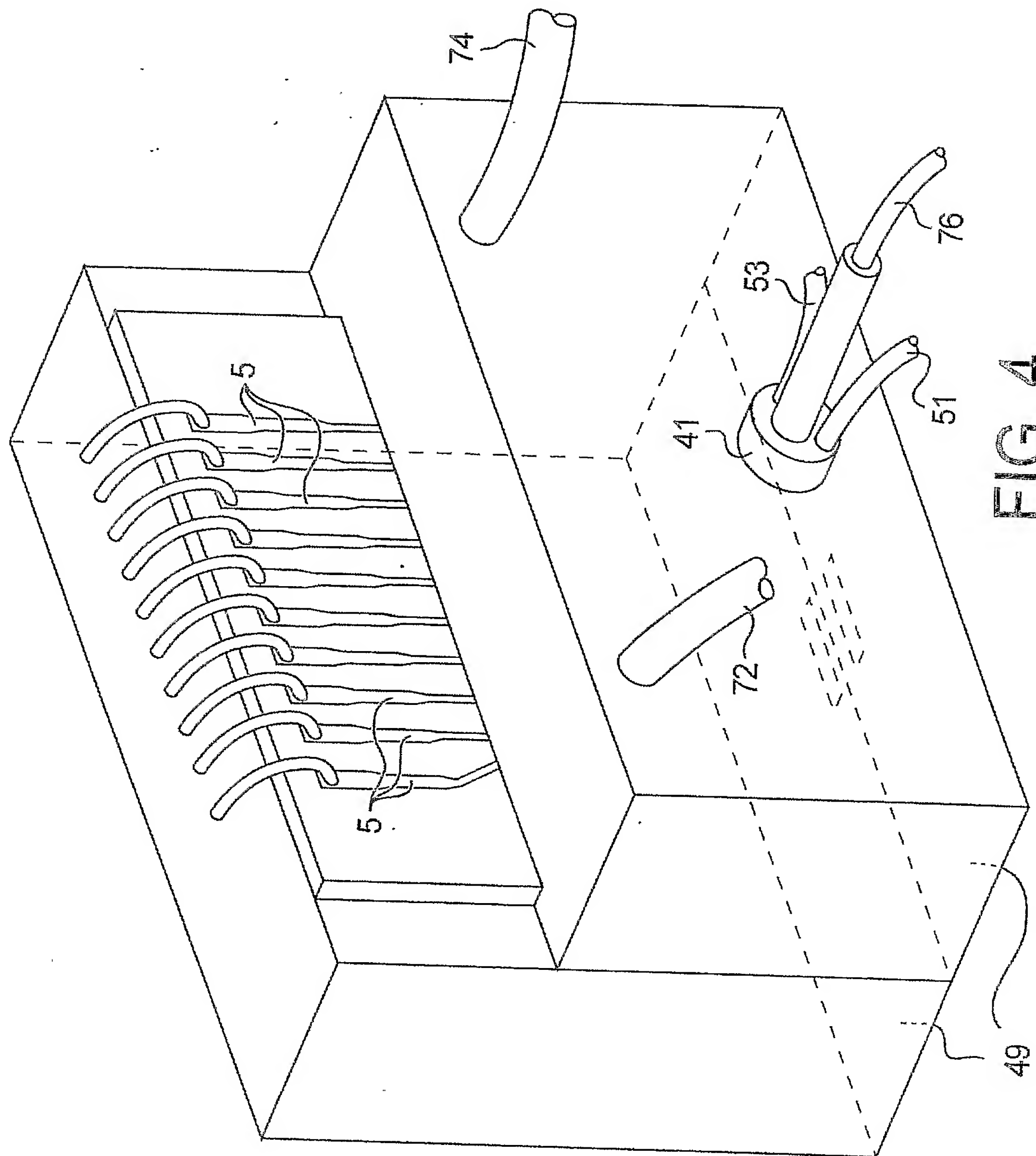


FIG. 4

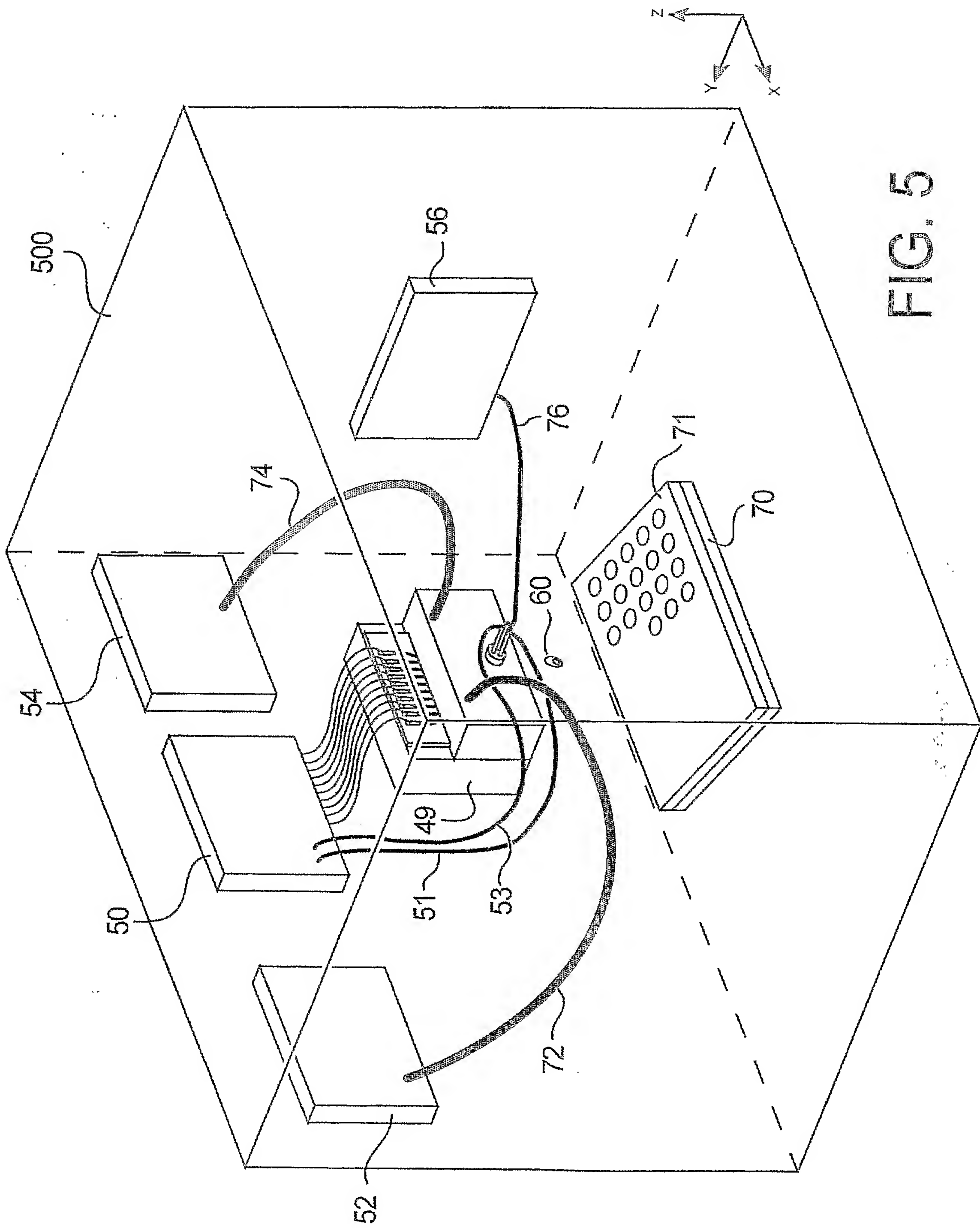


FIG. 5

5/5

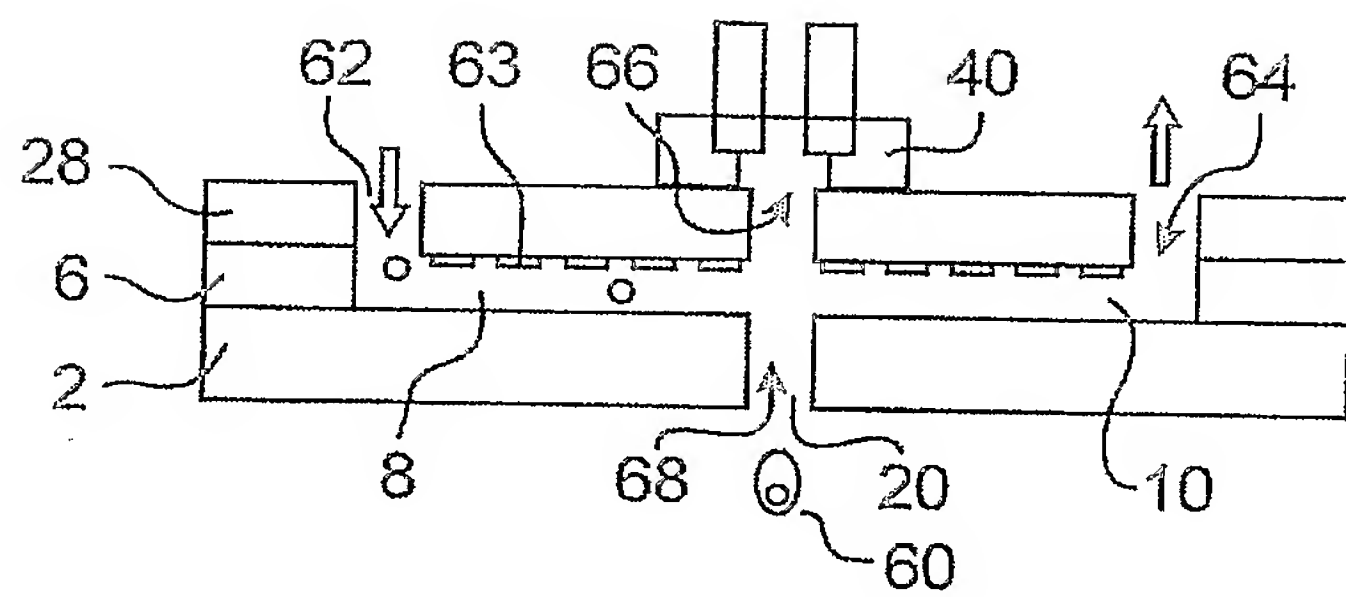


FIG. 6A

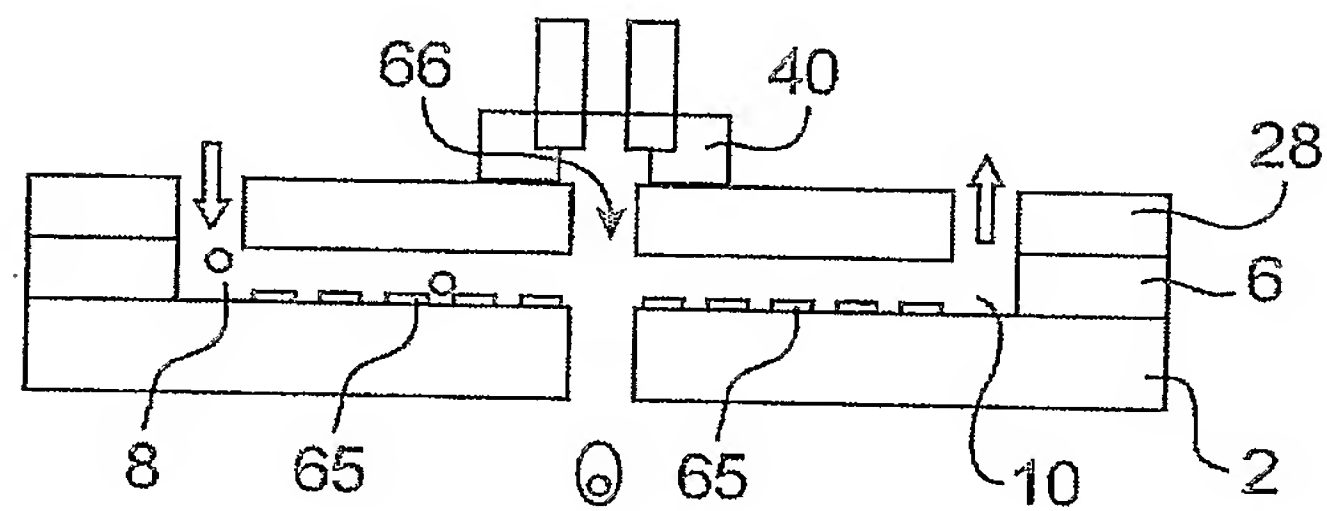


FIG. 6B

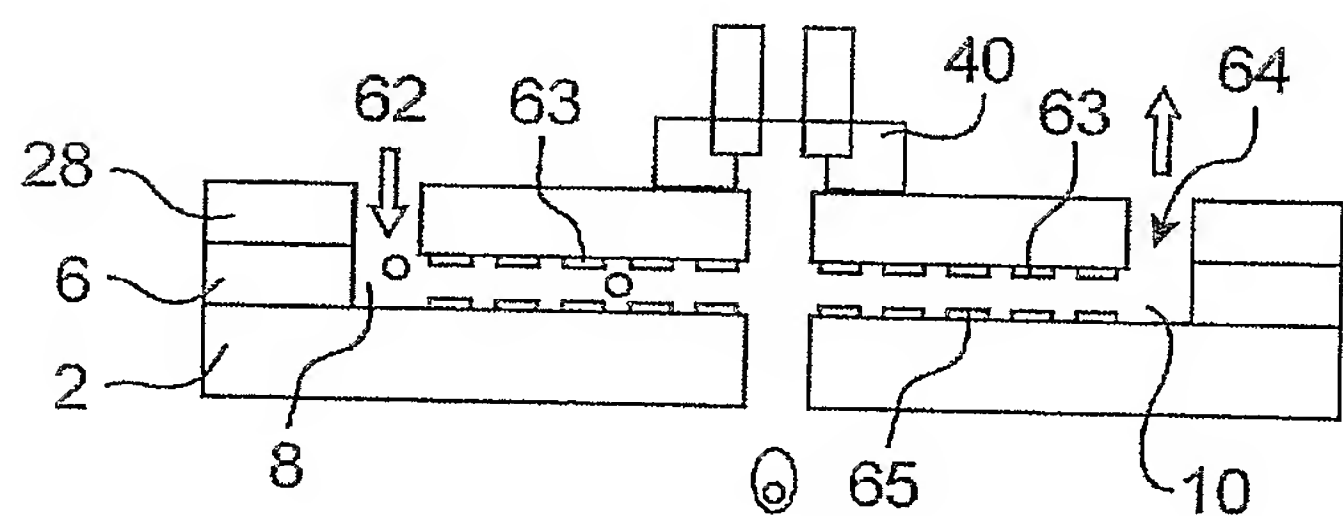


FIG. 6C

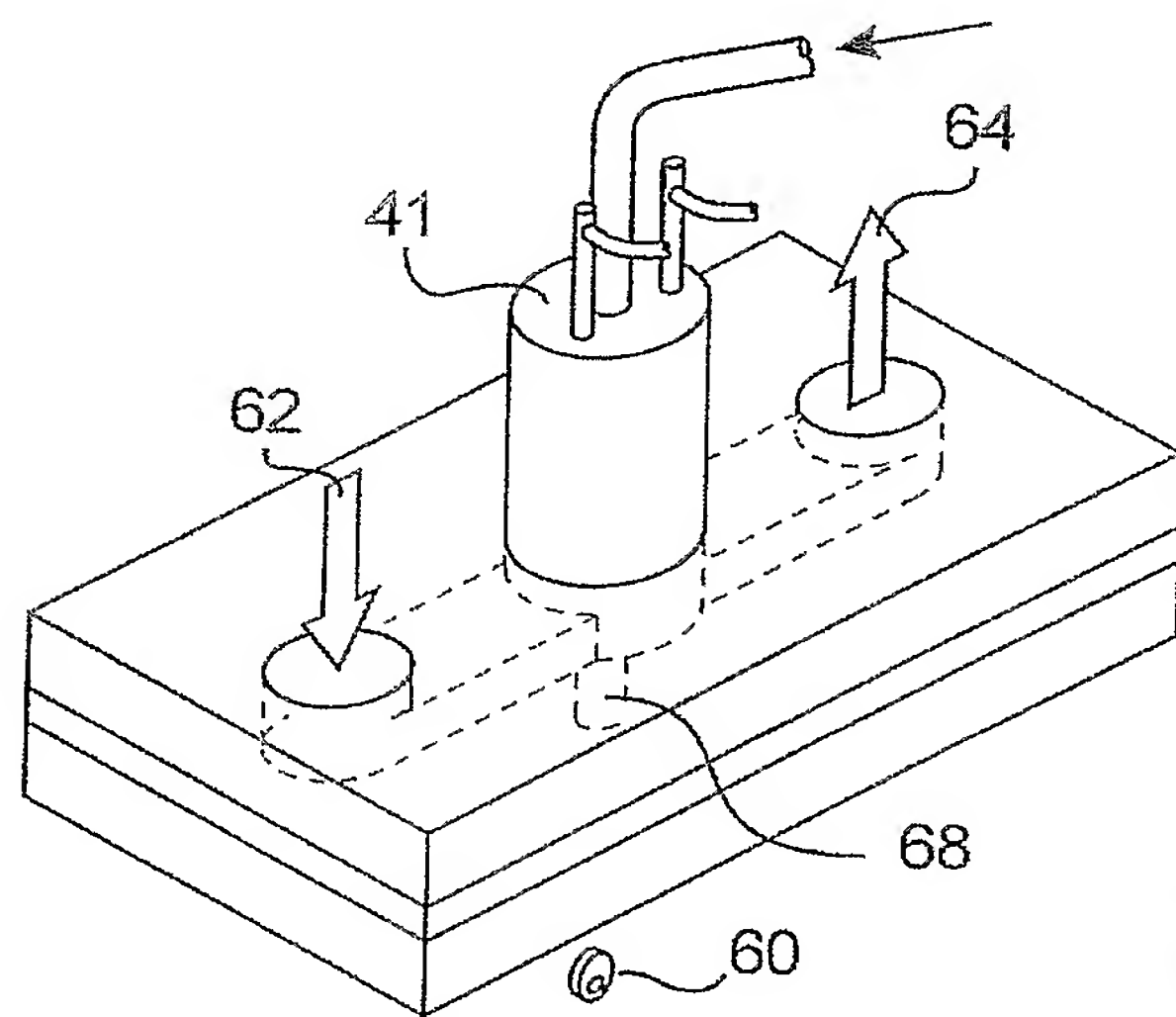
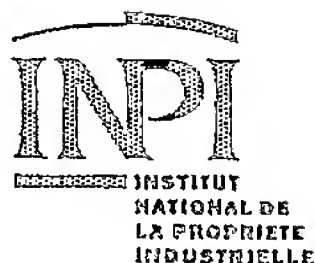


FIG. 6D



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75300 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

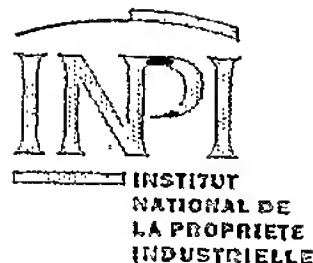
INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B14579.3/PM BD1524	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL			
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) DISPOSITIF DE DISPENSE DE GOUTTELETTES MICROFLUIDIQUES NOTAMMENT POUR LA CYTOMETRIE.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33 rue de la Fédération 75752 PARIS 15 ème. ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE 1015 LAUSANNE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :			
1 Nom		RENAUD	
Prénoms		Philippe	
Adresse	Rue	Chemin neuf, N°11	
	Code postal et ville	1 0 2 8 PREVERENGES Suisse	
Société d'appartenance (facultatif)			
2 Nom		PICOLLET-D'HAHAN	
Prénoms		Nathalie	
Adresse	Rue	Le Crozat	
	Code postal et ville	3 8 5 8 0 LA FERRIERE France	
Société d'appartenance (facultatif)			
3 Nom		HAGUET	
Prénoms		Vincent	
Adresse	Rue	25 rue d'Auvergne	
	Code postal et ville	2 2 9 5 0 TREGUEUX France	
Société d'appartenance (facultatif)			
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) PARIS LE 19 JANVIER 2004 G. POULIN			

reçue le 17/02/04



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)

B14579.3/PM BD1524

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

DISPOSITIF DE DISPENSE DE GOUTTELETTES MICROFLUIDIQUES NOTAMMENT POUR LA CYTOMETRIE.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
31-33 rue de la Fédération
75752 PARIS 15 ème.
ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE
1015 LAUSANNE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom

CHATELAIN

Prénoms

François

Adresse

Rue

143 rue Hector Berlioz

Code postal et ville

3 8 3 4 0 LE CHEVALON DE VOREPPE France

Société d'appartenance (facultatif)

2 Nom

Prénoms

Adresse

Rue

Code postal et ville

Société d'appartenance (facultatif)

3 Nom

Prénoms

Adresse

Rue

Code postal et ville

Société d'appartenance (facultatif)

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

PARIS LE 19 JANVIER 2004

G. POULIN

PCT/FR2005/050025

